

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-279169

⑤ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和63年(1988)11月16日

G 01 N 33/53
A 61 K 39/395
C 12 P 21/00

K-7906-2G
L-7252-4C
D-6712-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 20 (全12頁)

⑬ 発明の名称 糖脂質抗原に対するモノクローナル抗体、該抗体の産生法、および
その使用法

⑭ 特 願 昭63-74274

⑮ 出 願 昭63(1988)3月28日

優先権主張 ⑯ 1987年3月27日 ⑰ 米国(US) ⑱ 30537

⑲ 発 明 者 ゼノン・ステプロフス アメリカ合衆国ペンシルバニア州19355, マルヴァーン,
キ ウェルス・ロード 108エイ

⑳ 出 願 人 ザ・ウイスター・イン アメリカ合衆国ペンシルバニア州19104-4268, フィラデ
ステイチュート ルフィア, サーティツクス・ストリート・アット・ス
ブルース(番地なし)

㉑ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外4名
最終頁に続く

明 細 書

1. [発 明 の 名 称]

糖脂質抗原に対するモノクローナル抗体、該抗体の産生法、およびその使用法

2. [特 許 請 求 の 範 囲]

1. ジフコシル血液型抗原 Y-6 および B-7-2 決定基を含むと予想される試料を、モノクローナル抗体 BR 55-2 およびその変異型の特異性を持つ検出用標識モノクローナル抗体あるいはその断片の診断上有効量と接触させ、該抗体が該試料に結合するか否かを決定することからなる、ジフコシル血液型抗原 Y-6 および B-7-2 の検出法。

2. 該抗体が ATCC HB 9324 および ATCC HB 9347 からなる群から選択された細胞系によって産生される、特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 該検出が生体内で行なわれる、特許請求の範囲第1項記載の方法。

4. 該検出用標識が放射性同位体および常磁性

標識からなる群から選択される、特許請求の範囲第3項記載の方法。

5. 該検出が試験管内で行なわれる、特許請求の範囲第1項記載の方法。

6. 該検出用標識が放射性同位体、蛍光化合物、化学発光化合物、生物発光化合物、および酵素からなる群から選択される、特許請求の範囲第5項記載の方法。

7. モノクローナル抗体 BR 55-2 およびその変異型の特異性を有するモノクローナル抗体あるいはその断片の治療上有効量を悪性疾患を持つ動物体に投与することによる、動物の悪性疾患を抑制する方法。

8. 該モノクローナル抗体が ATCC HB 9324 および ATCC HB 9347 からなる群から選択される細胞系によって産生される、特許請求の範囲第7項記載の方法。

9. 該悪性疾患が腺癌である、特許請求の範囲第7項記載の方法。

10. 該投与が経口的である、特許請求の範囲

図第7項記載の方法、

1.1. 該非経口的投与が皮下、筋肉内、腹膜内、腔内、あるいは静脈内注射による、特許請求の範囲第10項記載の方法、

1.2. 該投与が約0.01mg/m²から約2000mg/m²の投与量である、特許請求の範囲第7項記載の方法、

1.3. 該抗体がエフェクター細胞とともに投与される、特許請求の範囲第7項記載の方法、

1.4. 該抗体が治療用に標識されている、特許請求の範囲第7項記載の方法、

1.5. 該治療用標識が放射性同位体、薬剤、免疫調節剤、生物反応修飾剤、レクチンおよび毒素からなる群から選択される、特許請求の範囲第14項記載の方法、

1.6. 該抗体が治療用薬剤と実質的に同時に投与される、特許請求の範囲第7項、第13項、および第14項記載のいずれかの方法、

1.7. 該治療用薬剤が放射性同位体、薬剤、免疫調節剤、生物反応修飾剤、レクチン および毒

素あるいは腫瘍細胞が認識可能な腺構造を形成する癌である。ヒト腺癌が血液型抗原および化学的に関連した構造に相当するフコ脂質を特徴的に発現していることを示唆する証拠が増加してきている(箱根、Annual Reviews of Immunology, 2:103-126, 1984)。血液型Yジフコシル化ハプテンは構造的に詳しく決定され、卵巣癌糖タンパク質として初めて記述された(ロイド(Lloyd)他、Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 61:1470-1477, 1968)。後に、糖脂質の形態で、このハプテンがイヌ腸(スミス(Smith)他、Biochimica Biophysica Acta, 338:171-179, 1975)、およびヒト胎児腸(カールソン(Karlsson)他、Journal of Biological Chemistry, 256:3512-3524, 1981)にも存在していることが見いだされた。より最近では、血液型A型の人よりもO型の人の赤血球により豊富に見られる、Y決定基構造の二量体および三量体を有する一連のより複雑な糖脂質が解析された(カンナギ(Kannagi)

素からなる群より選択される、特許請求の範囲第16項記載の方法、

1.8. 該治療用薬剤の該投与が該抗体の投与の約1日から約6日前に行なわれる、特許請求の範囲第16項記載の方法、

1.9. ATCC HB 9324あるいは ATCC HB 9347 によって産生されるモノクローナル抗体の特異性を持つモノクローナル抗体の悪性疾患を抑制する量および製薬上不活性な担体からなる医薬組成物、

2.0. 該悪性疾患が腺癌である、特許請求の範囲第19項記載の医薬組成物、

3. [発明の詳細な説明]

(産業上の利用分野)

本発明はヒト糖脂質抗原に対するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリッド細胞系、および、該モノクローナル抗体の使用法に関するものである、

(従来の技術)

腺癌(Adenocarcinoma)は腺組織由来の癌あ

他、Journal of Biological Chemistry, 260:6410-6415, 1985)。

該決定基はヒト肝臓腺癌中および、多糖として乳分泌期の女性の尿中にも存在することが見いだされた、

抗Y特異的活性を有する多数のモノクローナル抗体が、ヒト胃癌、結腸癌、肺癌、卵巣癌、および、ヒト卵巣奇形癌細胞を有するマウスを免疫することにより産生されてきた。Y決定基を有する抗原の蓄積は、イムノベルオキシダーゼ法によって、数種のヒト腺癌について報告されている。最近報告されたY決定基と癌初期抗原との関連は、上皮腺癌におけるYの診断用マーカーとしての妥当性を強調するものである(ニコルス(Nichols)他、Journal of Immunology, 135:1911-1913, 1985)。

Y決定基の存在は腺癌と関連する糖脂質で見いだされているが、Y決定基上のエピトープとのみ反応するモノクローナル抗体は臨床的に有用であるとは思われない、これは、与えられた腫瘍組織

内で多くの悪性細胞がY決定基を含む抗原を発現しているとしても、少数ではあるが重要な意味を持つ悪性細胞群はY決定基を発現せず、従ってY決定基モノクローナル抗体の投与に主眼を置く免疫治療に対してはおそらく抵抗性を示すと考えられるためである。腫瘍組織の再発を可能にするものはこれらの残存する細胞である。以上のことから、多様な抗原の多数の決定基上に存在するエピトープとの反応可能なモノクローナル抗体は、腺癌細胞の多数の異なる集団に結合できることによりはるかに優れた臨床的効果を有するため、必要とされている。

(発明が解決しようとする課題)

本発明の主な目的はY-6およびB-7-2の双方の決定基に結合する検出用標識を施したモノクローナル抗体を用いて、該検出用標識モノクローナル抗体が該決定基に結合するか否かを決定することにより、決定基Y-6およびB-7-2の検出法を与えることである。

本発明の別の目的は、決定基Y-6およびB-

7-2上に存在するエピトープと反応する検出用標識モノクローナル抗体を用いる、悪性度の *in vitro* および *in vivo* での診断法を与えることである。

本発明の別の目的は、決定基Y-6およびB-7-2と反応する非標識モノクローナル抗体あるいは治療用標識モノクローナル抗体を用いる、動物の悪性疾患の治療法を与えることである。

以上のように、本発明は決定基Y-6およびB-7-2を含むと予想される試料を診断上有効量のモノクローナル抗体BR55-2の特異性を持つ検出用標識モノクローナル抗体あるいはその断片と接触させ、該抗体が該試料に結合するか否かを決定することによるジフコシル血液型抗原Y-6およびB-7-2の検出法に関するものである。

本発明はさらに、治療上有効量のモノクローナル抗体BR55-2の特異性を持つモノクローナル抗体あるいはその断片を動物体に投与することからなる、動物の悪性疾患を抑制する方法に関するものである。

本発明の方法で用いたモノクローナル抗体の主な利点は、以前の技術によるモノクローナル抗体とは異なり、該モノクローナル抗体は多数の決定基上に存在するエピトープに結合できることである。そうすることにより、該モノクローナル抗体を利用する本発明の診断法および治療法は、一種以上の該決定基を発現している悪性細胞への結合が可能となる。さらに、該決定基は正常組織よりも悪性細胞ではるかに高頻度で発現しているため、結合の可能性は正常細胞に対するよりも悪性細胞に対する方がきわめて高い。この事実の結果により、臨床効果的であるが宿主細胞組織に対して最小の損傷あるいは全く損傷を与えないような濃度で本発明のモノクローナル抗体を使用することが可能である。

(課題を解決するための手段及び作用)

本発明は、腺癌およびその他の腫瘍細胞を指示する抗原に対する特異性を持つモノクローナル抗体に関するものである。該モノクローナル抗体は、該腫瘍に関連する抗原の *in vitro* および *in vivo*

の双方での免疫学的検出、および該抗原を含有する腫瘍の免疫治療に非常に有用である。

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの產生に使用される一般的方法は、本分野の通常の技術に熟達した者には既知のものである。本発明で用いた技術の実例は *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 75: 3405, (1978) およびコプロウスキー (Koprowski), "腫瘍抗体産生法" と題される米国特許第 4,172,124 号に記載されている。

概述すると、BALB/cマウスを培養した乳癌細胞 (MCF 7) で免疫し、後に同じ細胞系で追加刺激した。4日後、該動物を殺し、脾臓細胞をマウス骨髓腫 P3×63 Ag8 の 653 細胞と融合した。ハイブリドーマは抗体產生に関して選択し、陽性のクローンは細胞系 MCF 7 および他の癌細胞系に対する反応性を検定した。さらに、クラススイッチ機構を既知の技術を用いて產生し、単離した (ステブレウスキー (steplewski) 他、*Proceedings of the National Academy of*

Sciences, USA, 82:8653, 1985)。

本発明のモノクローナル抗体の特異性を持つモノクローナル抗体を分泌する他のハイブリドーマの単離は本分野の通常の技術に熟達した者が抗イディオタイプスクリーニング法(ポトクニャク(Potocnjak)他、Science, 215:1637, 1982)によって実施することができる。抗イディオタイプ抗体は、問題のハイブリドーマに産生されたモノクローナル抗体上に存在する単独の決定基を認識する抗体である。該決定基は抗体の超可変領域に位置する。与えられたエピトープに結合するのはこの領域であり、したがって、抗体の特異性を規定するものである。抗イディオタイプ抗体は問題のモノクローナル抗体で動物を免疫することにより調製できる。免疫した動物は該イディオタイプ決定基に対する抗体を産生することにより免疫した抗体のイディオタイプ決定基を認識し、反応するであろう。第二の動物の免疫に用いた単一のハイブリドーマに産生されるモノクローナル抗体に特異的である第二の動物の抗イディオ

定できる。

あるいは、発明者らは本発明のモノクローナル抗体の特異性を持つモノクローナル抗体が反応するエピトープ部分を解析したので(スリン(Thurin)他、前出)、同等のエピトープ特異性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマをさらに産生することは通常の技術の問題となる。血液型決定基Y-6およびB-7-2の炭水化物部分は、本発明のモノクローナル抗体が結合するエピトープを含んでおり、オゾン分解などの技術(サベサン(Sabesan)他、Canadian Journal of Chemistry, 62:1034, 1984)、あるいはエンドグリセロセラミダーゼなどでの特異的酵素加水分解(ヒト(Hito)他、Journal of Biological Chemistry, 262:142, 78, 1986)によって糖脂質の主要部分から精製される。したがって、細胞系ATCC HB 9324あるいはATCC HB 9347に産生されるモノクローナル抗体の特異性を有するモノクローナル抗体を分泌するさらなるハイブリドーマは、例えば、該エピトープをKLHなどの無害なあるいは免疫原的担体分子と結合させてエピトープを免疫原的形態にするこ

タイプ抗体を用いることにより、免疫感作に用いたハイブリドーマの抗体と正確に同じイディオタイプを有する他のクローンを同定することが可能になった。

二つのハイブリドーマのモノクローナル抗体の間のイディオタイプ同一性は、二つのモノクローナル抗体が同じエピトープ決定基を認識する点で同一であることを示す。したがって、あるモノクローナル抗体上のエピトープ決定基に対する抗体を用いることにより、同じエピトープ特異性モノクローナル抗体を発見する他のハイブリドーマを同定することが可能である。

本発明は糖脂質および糖タンパク質分子に結合している炭水化物決定基と反応するモノクローナル抗体、および該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関するものである。あるモノクローナル抗体が必要な特異性を持つか否かは、スリン(Thurin)他(Journal of Biological Chemistry, 262:372, 1987)のような抗原結合イムノアッセイを行なうことにより容易に決

とにより産生可能である(ハドソン(Hadson) & ヘイ(Hay)、Practical Immunology, p. 5-8, ブラックウェル・サイエンティフィック・パブリケーションズ, 1980)。この方法では、動物はまず一次感作のためにY-6糖脂質全体あるいはY-6糖脂質が豊富にある細胞画分で免疫し、次に、望ましいB細胞の増殖を刺激するための追加刺激として上記の精製抗原のエピトープ複合体で免疫される。あるいは、本発明のモノクローナル抗体と反応するエピトープは血液型決定基Y-6およびB-7-2の双方の上に存在しているので、まず一方の決定基、Y-6などで免疫し、次にB-7-2などの別の決定基で追加免疫をすることもできる。いずれの場合も、本発明のモノクローナル抗体のエピトープ特異性は明確に決定されているので(スリン(Thurin)、Journal of Biological Chemistry, 262:372, 1987)、ハイブリドーマ融合で存在する反応性B細胞のレパートリーを非常に制限することができ、それによって望みの特異性を持つハイブリドーマの単離

の際に不要な実験を避けることが可能である。融合後、該ハイブリドーマは該エピトープと遊離担体を用いて、該エピトープに特異的なモノクローナル抗体を産生するクローンを選択するためにスクリーニングを行なう。

異種供与体動物由来のモノクローナル抗体の別の受容体動物種への *in vivo* での使用は、通常は容易に行なわれるが、起こり得る問題は供与体抗体上に存在する抗原決定基に対する宿主の逆免疫反応が起きることである。ある場合には、この逆反応は、宿主内での供与体抗体の *in vivo* 使用ができないほど重大なものとなり得る。さらに、宿主逆反応は供与体抗体の悪性度抑制効果を阻害する場合がある。宿主内で起こる逆免疫反応の可能性を防ぐことのできる一つの方法は、キメラ抗体を用いることである(サン(sun)他、Hybridoma, 5(Supplement 1):S17, 1986; オイ(Oi)他、Bio Techniques, 4(3):214, 1986)。キメラ抗体は抗体のH鎖およびL鎖の様々な領域が一種以上のDNAによってコードさ

れている抗体である。一般に、キメラ抗体は望みの抗原特異性の抗体を産生する供与体由来のH鎖可変領域(V_H)およびL鎖可変領域(V_L)、および、宿主受容体の種由来のH鎖不変領域(C_H)およびL鎖不変領域(C_L)から成る。宿主免疫系の抗体領域、特に C_H 領域の抗原決定基への接触を減じることにより、受容体の種で起こる逆免疫反応の可能性を低減されと考えられている。したがって、例えば、ATCC HB 9324あるいはATCC HB 9347から単離されたDNAによってコードされるマウス V_H および V_L 領域およびヒト細胞から単離されたDNAにコードされる C_H および C_L 領域からなるヒトへの *in vivo* 臨床使用のためのキメラ抗体を作成することが可能である。

ある条件下では、一つのイソタイプのモノクローナル抗体は他のものよりも、その診断上あるいは治療上有効性の点で望ましい場合がある。例えば、イソタイプ ガンマー2aおよびガンマー3aのマウスモノクローナル抗体は腫瘍の増殖阻害においてガンマー1a イソタイプよりも有効であ

ることが知られている。この異なる有効性は、ガンマー2aおよびガンマー3a イソタイプが腫瘍細胞の細胞溶解性破壊により活発に関与する能力があるためだと考えられている。モノクローナル抗体の特別なイソタイプは、直接、第一の融合からの選択による調製、あるいは、二次的に、異なるイソタイプのモノクローナル抗体を分泌する親のハイブリドーマからクラススイッチ変異体を単離する血縁選択法(sib selection technique)を用いた調製のいずれでも得ることができる(ステブレウスキー(Steplewski)他、Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 82:8653, 1985; スピラ(Spira)他、Journal of Immunological Methods, 74:307, 1984)。以上のように、本発明のモノクローナル抗体はATCC HB 9324に産生されるモノクローナル抗体BR 55-2あるいはATCC HB 9347に産生されるモノクローナル抗体BR55-2-S2aの特異性を有するクラススイッチ変異型を含む。

本発明のモノクローナル抗体が断片の形態、例えばFabおよび $F(ab')^2$ 、で使用される場合、特に、該断片が治療用に標識されている場合には、この場合の腫瘍阻害はもはや補体媒介性細胞溶解性の腫瘍細胞破壊に依存しないため、いかなるアイソタイプも使用可能である。

本発明のモノクローナル抗体は *in vitro* あるいは *in vivo* の免疫診断あるいは免疫治療を行なうのに望ましいいかなる動物にも使用可能である。ここで用いる“動物”とは、ヒトおよびヒト以外の動物を含めたものを意味する。

本発明で用いる“抗体”という語は、完全な分子および、例えばFabおよび $F(ab')^2$ などのエピトープ決定基に結合可能なその断片を含むことを意味する。

本発明のモノクローナル抗体は、液相で、あるいは固体担体と結合させて用いるイムノアッセイでの使用が特に適している。さらに、該イムノアッセイのモノクローナル抗体は様々な方法で検出用に標識することが可能である。本発明のモノク

ローナル抗体を使用できるイムノアッセイの形式の例は、直接あるいは間接様式のいずれかの、競合あるいは非競合イムノアッセイである。該イムノアッセイの例は、ラジオイムノアッセイ(RIA)およびサンドウィッチ(免疫測定)アッセイである。本発明のモノクローナル抗体を用いた抗原の検出は、生理学的試料での免疫組織学的アッセイを含む、順相、逆相、および同時形式のいずれかで行なわれるイムノアッセイによって行なわれ得る。

本発明のモノクローナル抗体は多数の異なる担体に結合可能であり、腺癌関連抗原の存在の検出に用いることができる。広く知られた担体の例は、ガラスポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、テキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然セルロース、修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、および磁鉄鋼である。担体の性質は本発明の目的のためには可溶性、不溶性とも可能である。本分野の通常技術に熟達した者は、モノクローナル抗体に結合する他の適当な

より高い感度を得られる別の技術は、低分子量のハプテンを抗体に結合させることによる。該ハプテンは、続いて第二の反応によって特異的に検出され得る。例えば、アビジンと反応するビオチン、あるいは、特異的抗ハプテン抗体と反応するジニトロフェニル、ビリドキサル、およびフルオレセインなどのハプテンを用いるのが一般的である。

本発明で用いるように、“エпитープ”という語は、本発明のモノクローナル抗体と特異的に反応できるあらゆる決定基を含むことを意味する。エпитープ決定基は通常アミノ酸あるいは糖側鎖などの化学的に活性のある表面分子群からなり、また通常、特異的な三次元構造特性および特異的電荷特性を有する。

本発明のモノクローナル抗体を抗原の *in vivo* 検出に用いる場合、検出用標識モノクローナル抗体は診断上有効な投与量で与える。“診断上有効”という語は、検出用標識モノクローナル抗体の量が、該モノクローナル抗体が特異的に反応するジ

担体を知るであろうし、あるいは、通常の実験によって、そのようなものを確認できるであろう。

本分野の通常技術に熟達した者には多数の異なる標識及び標識法が知られている。本発明で使用する標識の型の例は、酵素、放射性同位体、蛍光化合物、化学発光化合物、および生物発光化合物を含む。本分野の通常技術に熟達した者は、モノクローナル抗体に結合する他の適当な標識を知るであろうし、あるいは、通常の実験を用いてその確認を行なうことができるであろう。さらに、本発明のモノクローナル抗体への該標識の結合は、本分野の通常技術に熟達した者には既知の標準的技術を用いて行なうことができる。

本発明の目的のためには、本発明のモノクローナル抗体によって検出される腺癌関連抗原は生物学的液体及び組織に存在することが可能である。検出可能量の腺癌関連抗原を含有するいかなる試料も使用可能である。通常は、試料は尿、唾液、脳脊髄液、血液、血清などの液体、あるいは、組織、便などの固体あるいは半固体が使用される。

フコシル抗原を持つ部位の検出を可能にするのに十分な量で投与することを意味する。投与される検出用標識モノクローナル抗体の濃度は、腫瘍部位への結合がバックグラウンドのシグナルと比較して検出可能である程度に十分であるべきである。さらに、検出用標識モノクローナル抗体は最良の腫瘍対バックグラウンドのシグナル比を得るために、循環系から迅速に除去されることが望ましい。

通例、診断のための検出用標識モノクローナル抗体の投与量は年齢、性、個体の疾患の程度などの因子に依存して変動する。モノクローナル抗体の投与量は 0.01 mg/m^2 から 20 mg/m^2 、望ましくは、 0.1 mg/m^2 から 10 mg/m^2 で変動し得る。

診療用 *in vivo* 像化のためには、使用可能な検出装置の型が与えられた放射性同位体の選択に於ける主要因子である。選択する放射性同位体は与えられた型の装置で検出可能な崩壊形式でなければならない。*in vivo* 診断のための放射性同位体選択に於けるさらに別の因子は、放射性同位体の半減期が、標的による最大取り込み時まで検出

可能な程度に長い、宿主に対する有害な照射が最小になる程度に短いことである。理想的には、*in vivo* 像化に用いる放射性同位体は粒子放出は欠くが、通常のガンマカメラで容易に検出できる140-250KeV程度の多数の光子を産出する。

in vivo 診断のために、放射性同位体は中間官能基を用いて直接あるいは間接に免疫グロブリンに結合することができる。金属イオンとして存在する放射性同位体の免疫グロブリンへの結合にしばしば用いられる中間官能基は、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)およびエチレンジアミン四酢酸(EDTA)などの二価性キレート試薬である。

本発明のモノクローナル抗体はまた *in vivo* 診断の目的で、磁気共鳴像化(MRI)あるいは電子スピン共鳴(ESR)において、常磁性同位体で標識する事もできる。一般に、診断像を視角化するあらゆる慣習的な方法も使用し得る。通常、カメラ像にはガンマおよび陽子放出放射性同位体を使用し、NMRには常磁性同位体を使用する。

試薬は、本発明のモノクローナル抗体に直接あるいは間接に結合することができる。間接的結合の一例は、スプレー部分の使用によるものである。一方、該スプレー部分は、不溶性あるいは可溶性のいずれでも可能であり(ディーナー(Diener)他、Science, 231:148, 1986)、標的部位のモノクローナル抗体分子からの薬剤放出を可能にすることで選択できる。免疫治療のための、本発明のモノクローナル抗体に結合できる治療用試薬の例は、薬剤、放射性同位体、免疫調節物質、レクチン、および毒素である。

本発明のモノクローナル抗体と結合可能な薬剤は、非蛋白様薬剤および蛋白様薬剤を含む。“非蛋白様薬剤”という語は、例えばマイトマイシンC、ダウノルビン、およびビンブラスチンなどの、古典的に薬剤と呼ばれた化合物を含む。

本発明のモノクローナル抗体を標識する蛋白様薬剤は、免疫調節物質および他の生体反応修飾物質を含む。“生体反応修飾物質”という語は、本発明のモノクローナル抗体が特異的に反応するジ

本発明のモノクローナル抗体はある個体に於ける悪性疾患の経路の追跡に用いることができる。したがって、悪性部位の大きさあるいは数の増加あるいは減少、あるいは多様な体液に流れる抗原の濃度変化を測定することにより、悪性度の改善を目的とした特定の治療法が効果的であるか否かを決定することができる。

本発明のモノクローナル抗体はまた、本発明のモノクローナル抗体と反応するエピトープを持つ腫瘍関連ジフコシル血液型抗原を発現する腫瘍を有する動物の免疫治療に単独で、あるいはエフェクター細胞との併用で用いることができる。この方法で用いる場合、モノクローナル抗体の投与量は、10 μ g/ m^2 から2000 μ g/ m^2 まで変動可能である。“治療上有効”という語は、用いるモノクローナル抗体量が悪性度による疾患の原因を改善するのに十分な量であることを意味する。

免疫治療に使用する場合、本発明のモノクローナル抗体は標識しない状態で、あるいは、治療用試薬で標識した状態で使用することができる。該

ジフコシル血液型抗原を含む腫瘍細胞の破壊を促進するような免疫反応の修飾に関与する物質を包含することを意味する。免疫反応修飾物質の例は、リンホカインの様な化合物を含む。リンホカインの例としては、腫瘍壊死因子、インターロイキン1、2、及び3、リンホトキシン、マクロファージ活性化因子、転移阻害因子、コロニー刺激因子、およびインターフェロンがある。本発明のモノクローナル抗体が標識され得るインターフェロンはアルファインターフェロン、ベータインターフェロン、およびガンマインターフェロンおよびそのサブタイプを含む。

免疫治療のために本発明の放射性同位体が結合したモノクローナル抗体を使用する際に、腫瘍の分布および体積、およびイソタイプの安定性および放射物などの因子に依存して、あるイソタイプが他のイソタイプよりも望ましい場合がある。必要ならば、腫瘍の分布および体積は上述の *in vivo* 診断法によって見積ることができる。存在する悪性度の型によって、ある放射性物質が他の

ものよりも望ましい場合がある。一般に、アルファおよびベータ粒子放射性同位体が免疫治療では望ましい。例えば、ある動物が固体腫瘍組織を有する場合は、 ^{90}Y などの、組織を数ミリメートル透過可能な高エネルギーベータ線放射物質が望ましい。一方、白血病などのように、悪性腫瘍が単独の標的細胞から成る場合には、 ^{212}Bi などの短射程高エネルギーアルファ線放射物質が望ましい。治療目的では単一のモノクローナル抗体を結合させる放射性同位体の例は ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{212}Bi 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{47}Sc 、 ^{109}Pd 、および ^{188}Re を含む。

レクチンは、通常植物性物質から単離される、特異的な糖鎖部分に結合するタンパク質である。多くのレクチンは、また、細胞を凝集させ、リンパ球を刺激することができる。しかし、リシンは免疫治療的に用いられてきた毒素性レクチンである。これは、毒素性に寄与するリシンのアルファヘプタド鎖が抗体分子に結合することによって部位特異的な毒素効果の放出を可能にすることに

抗体はアルファインターフェロンとの併用で使用できる。該治療法は、モノクローナル抗体と反応する抗原の癌細胞による発現を増大させることにより、癌を標的とするモノクローナル抗体を刺激する(グライナー(Greiner)他、Science、235:895、1987)。あるいは、本発明のモノクローナル抗体は、例えば、ガンマインターフェロンとの併用することができ、それにより、エフェクター細胞によるFc受容体の発現を活性化し、増大させ、結果としてモノクローナル抗体のエフェクター細胞に対する結合が促進され、標的腫瘍細胞が破壊される。本分野の通常の技術に熟達した者は、多数の生体反応修飾物質から本発明のモノクローナル抗体の有効性を促進するような望みのエフェクター機能を生じるものを選択することができるであろう。

上述のように、本発明のモノクローナル抗体を多様な治療用試薬と併用する場合、モノクローナル抗体と治療用試薬の投与は通常、実質的に同時に行なわれる。"実質的に同時"という語は、

より行なわれる。

毒素は、十分量与えるとしはしば致死となる。植物、動物、および微生物に産生される有毒物質である。ジフテリア毒素は本方法で使用可能な、コリネバクテリウム・ジフテリア(*Corynebacterium diphtheriae*)に産生される物質である。

該毒素は、適当な条件下では分離されるアルファおよびベータサブユニットから成る。毒素A成分は抗体に結合でき、本発明のモノクローナル抗体が特異的に反応するジフコシル抗原を発現する腫瘍への部位特異的な放出に使用される。

本発明のモノクローナル抗体に結合可能な他の治療用試薬は、本分野の通常の技術に熟達した者に知られており、容易に確認することができる。

本発明の標的あるいは非標的モノクローナル抗体はまた、上述のような治療用試薬との併用で使用可能である。特に望ましいのは、本発明のモノクローナル抗体と免疫調節物質および他の生体反応修飾物質を含む治療上の併用である。

したがって、例えば、本発明のモノクローナル

モノクローナル抗体と治療用試薬が時間的にかなり近接して投与されることを意味する。通常、モノクローナル抗体の前に治療用試薬を投与することが望ましい。例えば、治療用試薬はモノクローナル抗体の1日から6日前に投与され得る。治療用試薬の投与は、例えば腫瘍の性質、患者の状態、および試薬の半減期などの因子に依存して、毎日あるいは他のあらゆる間隔で行なうことができる。

本発明のモノクローナル抗体を用いて、ここで述べた特徴の全てを組み合わせた治療法を考案することが可能である。例えば、ある状態では治療用試薬(群)を、エフェクター細胞および同じあるいは異なる治療用試薬(群)と組み合わせた本発明のモノクローナル抗体に先だてて投与することが望ましい。例えば、腺癌患者に、まずガンマインターフェロンおよびインターロイキン-2を3日から5日間毎日投与し、5日目にエフェクター細胞およびガンマインターフェロン、インターロイキン-2と組み合わせた本発明のモノクローナル抗体を投与して治療することが望ましい

場合がある。

膜内に本発明のモノクローナル抗体を持つリボソーム、ジフコシル血液型抗原Y-6およびB-7-2を発現する腫瘍領域で特異的にリボソームを射出するために使用することができる。該リボソームは、モノクローナル抗体に加え、腫瘍部位で放出される上述のような免疫治療試薬などを含むように作成することが可能である(ウォルフ(Wolf)他、Biochemica et Biophysica Acta, 802:259, 1984)。

本発明のモノクローナル抗体投与の投与量範囲は、ジフコシル抗原を発現している腫瘍の症状が改善されるような望ましい効果が得られる程度に十分多いものである。投与量は、不要な交差反応、過敏反応などの副作用を引き起こすほど多いべきではない。一般に、投与量は年齢、状態、性、および患者の疾患の程度によって様々であり、本分野の通常の技術に熟達した者によって決定され得る。投与量は、あらゆる逆反応、免疫寛容あるいは同様の状態の場合に応じて個々の医師によ

あるいは懸濁液を含む。非経口薬剤は、塩化ナトリウム溶液、リンガー・デキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リンガー液、あるいは不揮発性油を含む。静脈内薬剤は、リンガー・デキストロースなどを基本にした、液体および栄養補給液、電解質補給液を含む。保存剤および抗菌剤、酸化防止剤、キレート試薬、および不活性ガスなどの他の添加物も存在しうる。

本発明はまた、本発明のモノクローナル抗体を含む薬剤あるいは製薬的組成、本発明のモノクローナル抗体と反応するジフコシル血液型抗原を発現している腫瘍の治療に用いられる薬剤に関するものである。

モノクローナル抗体は本発明で使用される。BR55-2はATCC寄託番号HB 9324を有する細胞系から得られた抗体から得られるか、あるいは、該抗体と同一の性質を持つ。BR55-2-S2aは、ATCC寄託番号HB 9347を有する細胞系から得られた抗体から得られるか、あるいは、該抗体と同一の性質を有する。これらの細胞系は、

て適用され得る。投与量は一回の投与あたり0.1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ から2000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、望ましくは0.1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ から500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ の範囲で、毎日一回以上の投与で一日から数日間である。一般に、本発明のモノクローナル抗体が治療用試薬と結合して投与されるばあいには、in vivo 免疫診断の像化に用いたような低投与量で用いられる。

本発明のモノクローナル抗体は注射あるいは長時間の漸次的な灌流によって非経口的に投与される。本発明のモノクローナル抗体は静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、腔内、あるいは経皮的に、単独であるいはエフェクター細胞との組合せで投与することが可能である。

非経口投与のための準備は、滅菌水溶液あるいは滅菌非水溶液、懸濁液、および乳濁液を含む。非水溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性溶媒は、生理食塩水および緩衝液を含む。水、アルコール/水溶液、乳濁液、

1987年3月27日に先立ち、米国メリーランド州ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に30年間寄託された。(実施例)

以上の記述は、本発明を、一般的に述べたものである。より完全な理解は、ここに本発明の範囲を制限する意図ではなく例示の目的のみで示す以下の特異的な実例を参照することによって得られるであろう。

実施例 1

腺癌関連抗原に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系の調製

A. 免疫およびハイブリドーマの産生

BALB/Cマウス 2×10^7 細胞の胸腺癌MCF-7で腹腔内に免疫し、4週間後に 1×10^6 細胞で静脈内に追加免疫した。4日後、該動物を殺し、脾臓細胞をマウス黒色腫P3X 63 Ag8の653誘導体と融合した。増殖、クローニング、および産生されたハイブリドーマの維持はコプロウスキー(Koprowski)他、(Somatic Cell Genetics,

5:957, 1979)に示されたように行なった。多様なハイブリドーマに産生されたモノクローナル抗体は抗体産生に関してスクリーニングを行い、陽性のクローンはさらに細胞系 MCF-7 に対する反応性およびヒト黒色腫細胞系 WM164 他に対する非反応性についてスクリーニングを行った。選択された培養液は、次に、制限希釈法 (Limiting dilution technique) を用いてクローニングした。ハイブリドーマクラススイッチ変異体はステブレウスキー (Steplewski) 他 (Proceedings of the National Academy of Science, USA. 82:8653, 1985) による方法を用いて産生した。BR55-2 および BR55-2-S2a のエビトープ特異性の解析は報告されている (スリン (Thurin) 他, Journal of Biological Chemistry, 262:372, 1987)。モノクローナル抗体は、セアーズ (Sears) 他 (THE LANCET, 762, April 3, 1982) による臨床試験のために精製した。

細胞が白血球転移によって、IBM 2997 血液細胞分離機を用いた通常の方法で得られ、総数 1×10^9 から 1×10^{10} の単核細胞が得られた。白血球転移によって得られた該細胞は、総体積が160から200mlのプラスチック・バッグに集めた。患者腫瘍に反応するモノクローナル抗体 (各々150-200 μ g) を次に直接白血球のバッグに注入し15分ごとに緩やかに振とうしながら一時間室温でインキュベートした。その間に、該モノクローナル抗体はFcレセプターによってエフェクター細胞に結合することができ、それによってエフェクター細胞が腫瘍を標的とするためのベクターとして働くことができる。白血球バッグの上清中の遊離モノクローナル抗体の標本抽出により、平均して注入した抗体量の40%が正常派生細胞に結合することが示された。このインキュベーション後、正常派生細胞の混合液および白血球バッグ内の遊離モノクローナル抗体は、末梢静脈あるいは肝臓動脈に2時間から3時間をかけて再注入した。注入後、可能な遅滞した副作用を処理する

B. 糖脂質

多様な血液型抗原の精製および解析は実質的にスリン他 (Journal of Biological Chemistry, 260:14556, 1985) による方法によって行なった。

実施例 2

BR55-2-S2aを用いたヒトの in vivo 臨床試験

再発、転移あるいは切除不能な腫瘍を示す末期胃腸癌の患者が、75才以下で、カルノスキー指数が60以上であり、余命が3カ月以上であり、初期の腫瘍の型が生検により胃腸管腺癌であると明確に同定された場合に、本研究に含めた。

患者の腫瘍、あるいは可能な場合は転移生検標本をモノクローナル抗体 BR55-2-S2a, CO 19-9, GA 73-3 および CO 17-1A を用いて抗原発現の試験を行なった。これらの個々の免疫組織化学的結果を基礎に、モノクローナル抗体の混合物を患者に投与した。

患者の治療中に、正常に派生する末梢血液単核

ため、管を血管中に保持した。患者の血圧、心拍、悪寒、皮膚の発疹、気管支けいれんあるいは他の疑わしい臨床的徴候について、注入時およびその後24時間後に再度注意深く検査した。臨床試験第一段階の結果を表1に示した。

表 1

BR55-2-S2a^aを用いた第一次臨床試験の結果

癌治療		治療に反応して	
起源	転移	患者	安定な月数 ^b
結腸	肝臓	9	
		14	6
		25	6、+
	肺	39	7、+
		12	0
		26	8、+
	肝臓、胸腺	34	0
	肝臓、肺	40	7、+
	皮膚	36	0
	局所リンパ	43	6
	結節		

胸	骨、皮膚	2	腫瘍退行
	胸腺、皮膚	27	5、+
直腸	肝臓	10	2
		15	2
		17	5
		30	15
		33	8、+
胃	局部	18	3
	再発		
	肺	38	7、+
すい臓	切除不能	20	9
	肝臓	22	8
		31	2
	肝臓、リンパ結節	32	6
	リンパ結節	35	1

a 他のモノクローナル抗体およびエフェクター細胞との混合物中のガンマー2A誘導体

b “+” は患者がデータ編集の時点で依然として安定であることを示す。

B55-2-S2aで治療した患者は、結腸(10)、胸(2)、直腸(5)、腎管(2)、およびすい臓(5)の一次腫瘍組織を持っていた。上述のように、全ての患者はある程度の転移を有していた。このデータをさらに表2にまとめた。

表 2
臨床の要約

腫瘍起源	患者数	反応		
		なし	一次的安定	持続的安定
結腸	10	4	2	4
胸	2	—	—	4 a
直腸	5	—	4	1
腎	2	—	1	1
すい臓	5	—	5	—
計	24	4	12	8

a 一人の患者は腫瘍の退行を示した。

ここに示される様に、本実験でBR55-2-S2aを注入された24患者のうち、4人が明らかにモノクローナル抗体治療に反応しなかった。治療が良い方に働いた20人の患者のうち、12人は時間的には平均5.3ヶ月間安定だった。治療の効果があつた残りの8人の患者はデータをまとめた時点で依然として安定であった。持続的な安定性を示したこの患者群の中で、治療に対する平均の反応既刊は6.9カ月であり、腫瘍の退行をしめた患者を一人含む。

本発明を詳細に述べてきたが、本分野の通常の技術に熟達した者には、本発明の本質あるいは範囲から逸脱することなく、様々な変化および修飾がなされ得ることは明らかであろう。

代理人 弁理士 謝 茂 恭



(外4名)

第1頁の続き

⑤Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

G 01 N 33/577
// C 07 K 15/04

B-7906-2G
8318-4H

⑫発 明 者 ヒラリー・コプロウス
キ

アメリカ合衆国ペンシルバニア州19096, ワインウッド,
フェアヒル・ロード 334

⑬発 明 者 マグダレナ・スリン

アメリカ合衆国ペンシルバニア州19104, フィラデルフィ
ア, スプルース・ストリート4418, アパートメント エッ
チー2